



REC'D 29 NOV 1999 / 02739

REC'D 29 NOV 1999
WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### DOCUMENT DE PRIORITÉ

### COPIE OFFICIELLE

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE  
17.1.a) OU b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 AOUT 1999

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE**

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa  
N° 55-1328

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

16 NOV 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 14147

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT



DATE DE DÉPÔT

10 NOV. 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention  demande divisionnaire  
 certificat d'utilité  transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale  
brevet d'invention

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Hoechst Marion Roussel  
Monsieur VIEILLEFOSSE Jean-Claude  
102, Route de Noisy  
93235 ROMAINVILLE CEDEX

n° du pouvoir permanent  références du correspondant  
pg 06335 ML/2504

téléphone  
0149915727

date

certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

diffère  immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance  oui  non

Titre de l'invention (200 caractères maximum) **Gène tfIIIA de Candida albicans (CatfIIIA) et la protéine codée CATfIIIA.**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 5 5 2 0 8 1 4 7 3 code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Hoechst Marion Roussel

Forme juridique

Société Anonyme à  
Directoire et Conseil  
de Surveillance

Nationalité (s) **FRANCAISE**

Adresse (s) complète (s)

Pays

1, Terrasse Bellini  
92800 PUTEAUX

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTIÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Jean Claude VIEILLEFOSSE



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9814147 Cas 2504

## DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

**TITRE DE L'INVENTION: Gène tfIIIA de Candida albicans (CatfIIIA) et la protéine codée CATfIIIA.**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) **Jean Claude VIEILLEFOSSE**

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- BORDON-PALLIER Florence  
37, Boulevard Beethoven  
78280 GUYANCOURT
- CAMIER Sylvie  
66 Oakmont Avenue  
PIEMONT, CA 94610  
USA
- SENTENAC André  
Service de Biochimie et génétique moléculaire  
Bât. 142  
CEA/SACLAY  
91191 GIF SUR YVETTE CEDEX

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

  
Jean Claude VIEILLEFOSSE

Gène tfIIIA de Candida albicans (CatfIIIA) et la protéine codée CATfIIIA.

La présente invention concerne le facteur de transcription de *Candida albicans* nommé ci-après CATfIIIA et ses analogues ainsi que les polynucléotides (ARN, ADN) codant pour cette protéine ou pour les polypeptides analogues de cette protéine.

La présente invention concerne également le procédé de préparation de ces polypeptides et polynucléotides, leur utilisation pour l'étude des mécanismes de la transcription chez *Candida albicans* et pour la préparation d'inhibiteurs de ce facteur de transcription CATfIIIA pouvant être utilisés comme agent antifongiques et les compositions pharmaceutiques contenant de tels inhibiteurs.

La présente invention concerne donc notamment un nouveau facteur de transcription de *Candida albicans* et la séquence d'ADN codant pour ce facteur de transcription, leur préparation et leurs utilisations.

Nous utiliserons également ci-après les abréviations suivantes : AA pour acides aminés, AN pour acides nucléiques, ARN pour acide ribonucléique, RNase pour ribonucléase, ADN ou DNA pour acide désoxyribonucléique, ADNc pour ADN complémentaire, pb pour paires de bases, PCR pour réaction en chaîne par une polymérase, CA ou *Candida a.* pour *Candida albicans* et SC ou *Saccharomyces c.* pour *Saccharomyces cerevisiae*.

On utilisera également le terme screening qui désigne une technique de criblage spécifique et le terme primer qui désigne un oligonucléotide utilisé en amorce.

Le terme polynucléotides désigne ci-après les polynucléotides de la présente invention soit les séquences d'ADN et également ARN codant pour le facteur CATfIIIA de la présente invention et ses homologues ayant la même fonction de facteur de transcription. Le terme CAtfIIIA a le sens donné ci-dessus à polynucléotides.

Le terme polypeptides désigne ci-après les polypeptides de la présente invention soit le facteur CATfIIIA de la

présente invention et ses analogues ou homologues fonctionnels tels que définis ci-après, ayant donc la même fonction de facteur de transcription. Le terme CATFIIIA a le sens donné ci-dessus à polypeptides.

5 Nous appellerons tfIIIA (ou tfC2) le gène codant pour le facteur de transcription TFIIIA tandis que CAtfIIIA (ou CAtfC2) désigne le gène codant pour le facteur de transcription de *Candida albicans* CATFIIIA.

Le spectre des infections fongiques connues s'étend de 10 l'attaque fongique de la peau ou des ongles à des infections mycotiques plus graves d'organes internes. De telles infections et les maladies qui en résultent sont identifiées comme des mycoses. Des substances antimycotiques à effets fongistatiques ou fongicides, sont utilisées pour le 15 traitement de ces mycoses.

La présente invention concerne ainsi l'identification de substances antimycotiques et notamment de substances anti-*Candida albicans*.

La présente invention concerne ainsi des inhibiteurs de 20 facteurs de transcription pouvant être utilisés comme agents antifongiques.

*Candida albicans* est une levure pathogène qui cause des maladies infectieuses dans l'organisme humain. Dans le but de trouver des moyens de traiter des maladies, on peut choisir 25 des cibles intracellulaires et le facteur de transcription TFIIIA peut être l'une de ces cibles.

Dans les organismes eucaryotes, ce facteur joue un rôle clé dans l'initiation de la transcription des gènes ARN 5S par la RNA-polymérase III. En particulier, pour SC qui est une 30 levure proche de CA, il a été montré que cette levure SC ne pouvait pas survivre sans une source additionnelle de ARN 5S lorsque le gène chromosomique du facteur TFIIIA était interrompu, cet ARN 5S additionnel étant synthétisé au moyen d'un plasmide sans la participation du facteur TFIIIA (référence: 35 S. Camier, A.-M. Dechampesme, A. Sentenac./Proc. Natl. Acad. Sci. (1995) 92, 9338-9342).

Le gène tfIIIA et la protéine correspondante TFIIIA seraient impliqués dans la régulation du mécanisme biologique

de la transcription comme indiqué ci-après.

Depuis que la protéine TFIIIA a été purifiée comme facteur de transcription pour la première fois en 1980 à partir d'ovocytes de Xénope [Segall et al, J. Biol. Chem., 5 255, 11986-11991 (1980)], des travaux ont été menés *in vivo* et *in vitro* dans le Xénope pour étudier le mécanisme de contrôle de la transcription exercé par TFIIIA. On a ainsi montré que TFIIIA de Xénope est nécessaire pour l'initiation de la transcription du gène ARN 5S [Sakonji et al, Cell 19, 10 13-25 (1980)] et se lie à une région de contrôle interne du gène ARN 5S [Bogenhagen et al, Cell, 19, 27-35 (1980)].

La séquence en nucléotides de l'ADNc de tfIIIA de xénope et la séquence correspondante en acides aminés ont déjà été publiées [Ginberg et al, Cell, 39, 479-489 (1984)]. On peut 15 noter que ce gène code pour une protéine ayant 9 doigts de zinc, un doigt de zinc correspondant à un motif contenant deux cystéines et deux histidines reliées par un atome de zinc (CYS2 HIS2) (C2H2). Cette structure en doigt de zinc constitue un domaine de liaison des protéines à l'ADN et est 20 donc considérée comme un domaine essentiel pour un groupe de protéines qui se lient à l'ADN (DNA binding proteins). [Miller et al, Embo J., 4, 1607-1614 (1985)]

On peut noter que l'on connaît d'autres facteurs de transcription se liant à l'ADN qui possèdent également cette 25 structure en doigt de zinc tels que par exemple, chez l'être humain, XT1 du gène de la tumeur humaine de Wilms, [Gessier et al, Nature, 343, 774-778 (1990)], le répresseur humain de transcription YY1 [Shi et al, Cell, 67, 377-388 (1991)], la protéine MAZ associée au promoteur cMYC [Bossone et al, Proc. 30 Natl. Acad. Sci., USA, 89, 7452-7456 (1992)] ou encore spl [Kuwahara et al, J. Biol. Chem., 29, 8627-8631 (1990)].

L'étude de différents organismes tels que notamment l'homme, le xénope ou *Candida albicans* a montré qu'il existe ce que l'on peut appeler une famille de facteurs de transcriptions TFIIIA possédant les caractéristiques suivantes : 35

- ils sont associés à l'ARN polymérase III
- ils possèdent 9 doigts de zinc
- ils sont indispensables pour la transcription du gène

codant pour l'ARN 5S.

Une fonction essentielle connue de la protéine codée par le gène tfIIIA (tfC2) de la levure est d'initier la transcription du gène de l'ARN 5S chez *Saccharomyces cerevisiae* (Camier et al., Proc. Natl. Acad. Sa USA (1995) 92 : 9338-9342).

La présente invention a ainsi permis d'isoler les polynucléotides ADN et ARN codant pour la protéine du facteur de transcription CATFIIIA de *Candida albicans* et de révéler leurs séquences nucléotidiques.

La présente invention a donc pour objet un polynucléotide isolé contenant une séquence nucléotidique choisie dans le groupe suivant :

- a) un polynucléotide ayant au moins 50 % ou au moins 60% et de préférence au moins 70 % d'identité avec un polynucléotide codant pour un polypeptide ayant la fonction de facteur de transcription et ayant une séquence en acides aminés homologue de la séquence SEQ ID N°3 indiquée ci-après.
- b) un polynucléotide complémentaire du polynucléotide a)
- c) un polynucléotide comprenant au moins 15 bases consécutives du polynucléotide défini en a) et b).

La présente invention a ainsi pour objet un polynucléotide défini ci-dessus tel que ce polynucléotide est un ADN.

La présente invention a ainsi pour objet un polynucléotide défini ci-dessus tel que ce polynucléotide est un ARN.

La présente invention a plus précisément pour objet le polynucléotide tel que défini ci-dessus comprenant la séquence de nucléotides SEQ ID N°1.

La présente invention a ainsi permis d'isoler la séquence d'ADN codant pour le facteur de transcription de *Candida albicans* CATFIIIA.

La présente invention a également permis de révéler la séquence d'acides nucléiques du gène CAtfIIIA et également la séquence d'acides aminés de la protéine CATFIIIA codée par ce gène.

La présente invention a ainsi pour objet une séquence d'ADN telle que définie par le polynucléotide ci-dessus

caractérisée en ce que cette séquence d'ADN est celle du gène CAtfIIIA codant pour une protéine ayant la fonction biologique du facteur de transcription de *Candida albicans* CATFIIIA et contenant la séquence de nucléotides SEQ ID N01

5 Une telle séquence SEQ ID n°1 de la présente invention comprend donc 2060 nucléotides.

La présente invention a précisément pour objet une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus ayant la séquence commençant au nucléotide 720 et se terminant au nucléotide

10 1955 de SEQ ID N01.

Une telle séquence comprend donc 1236 nucléotides.

La présente invention a aussi pour objet la séquence d'ADN du gène CAtfIIIA telle que définie ci-dessus codant pour la séquence d'acides aminés SEQ ID N°3.

15 La séquence SEQ ID N°3 comprend donc 412 AA.

La présente invention a particulièrement pour objet la séquence d'ADN codant pour le facteur de transcription CATFIIIA telle que définie ci-dessus ainsi que les séquences d'ADN qui hybrident avec celle-ci et/ou présentent des 20 homologies significatives avec cette séquence ou des fragments de celle-ci et ayant la même fonction.

La présente invention a également pour objet une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus comprenant des modifications introduites par suppression, insertion et/ou 25 substitution d'au moins un nucléotide codant pour une protéine ayant la même activité biologique que le facteur de transcription CATFIIIA.

La présente invention a notamment pour objet la séquence d'ADN telle que définie ci-dessus ainsi que les séquences 30 d'ADN qui ont une homologie de séquence nucléotidique d'au moins 50 % ou au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec ladite séquence d'ADN.

La présente invention a ainsi également pour objet la séquence d'ADN telle que définie ci-dessus ainsi que les 35 séquences d'ADN qui codent pour une protéine de fonction similaire dont la séquence en AA a une homologie d'au moins 40 % et notamment de 45 % ou d'au moins 50 %, plutôt au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec la séquence

en AA codée par ladite séquence d'ADN.

Par séquences qui hybrident, on inclut les séquences d'ADN qui hybrident avec l'une des séquences d'ADN ci-dessus sous des conditions standard de stringence élevée, moyenne ou 5 basse et qui codent pour un polypeptide ayant la même fonction de facteur de transcription. Les conditions de stringence sont celles réalisées dans les conditions connues de l'homme du métier telles que celles décrites par Sambrook et al, Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory 10 Press, 1989. De telles conditions de stringence sont par exemple une hybridation à 65°C, pendant 18 heures dans une solution 5 x SSPE ; 10 x Denhardt's ; 100µg/ml ADNss ; 1 % SDS suivie de 3 lavages pendant 5 minutes avec 2 x SSC ; 0,05 % SDS, puis 3 lavages pendant 15 minutes à 65°C dans 1 x 15 SSC ; 0,1 % SDS. Les conditions de forte stringence comprennent par exemple une hybridation à 65°C, pendant 18 heures dans une solution 5 x SSPE ; 10 x Denhardt ; 100µg/ml ADNss ; 1 % SDS suivie de 2 lavages pendant 20 minutes avec une solution 2 x SSC ; 0,05 % SDS à 65°C suivis d'un dernier 20 lavage pendant 45 minutes dans une solution 0,1 x SSC ; 0,1 % SDS à 65°C. Les conditions de stringence moyenne comprennent par exemple un dernier lavage pendant 20 minutes dans une solution 0,2 x SSC, 0,1 % SDS à 65°C.

Par séquences qui présentent des homologies significatives, on inclut les séquences ayant une identité modérée ou importante de séquence nucléotidique avec l'une des séquences d'ADN ci-dessus et qui codent pour une protéine ayant la même fonction de facteur de transcription.

Par séquence d'ADN similaires, on entend ainsi des 30 séquences d'ADN qui peuvent appartenir à d'autres mycètes que Candida albicans et notamment à SC, et qui sont similaires ou identiques à la séquence d'ADN du gène de Candida albicans CatfIIIA. Ces séquences d'ADN similaires ne sont pas forcément identiques à la séquence d'ADN du gène de Candida 35 albicans CatfIIIA. L'homologie de séquence au niveau nucléotidique peut-être modérée ou importante. La présente invention concerne ainsi notamment les séquences d'ADN qui présentent une homologie de séquence nucléotidique d'au moins

50 %, de façon préférée d'au moins 60 % et de façon encore plus préférée d'au moins 70 % avec la séquence CAtfIIIA de la présente invention.

De plus, ces séquences d'ADN similaires ne codent pas forcément pour des protéines identiques, au niveau de la séquence en acides aminés, à la protéine codée par le gène CAtfIIIA. Ainsi la présente invention concerne notamment les séquences d'ADN qui codent pour des protéines dites homologues ayant une homologie de séquence en acides aminés d'au moins 40 %, notamment 45%, de façon préférée au moins de 50 %, de façon plus préférée au moins de 60 % et de façon encore plus préférée au moins de 70 % avec la protéine codée par CAtfIIIA de la présente invention.

Le gène de la présente invention est représenté comme une séquence ADN simple brin comme indiqué dans SEQ ID N°1 mais il est entendu que la présente invention inclut la séquence ADN complémentaire de cette séquence ADN simple brin et inclut également la séquence ADN dite double brin constituée de ces deux séquences ADN complémentaires d'une de l'autre.

La séquence d'ADN telle que définie ci-dessus est un exemple de combinaison de codons codant pour les acides aminés correspondant à la séquence d'acides aminés SEQ ID N°3, mais il est entendu également que la présente invention inclut toute autre combinaison arbitraire de codons codant pour cette même séquence d'acides aminés SEQ ID N°3.

Pour la préparation des polynucléotides et notamment des séquences d'ADN telles que définies ci-dessus, des séquences d'ADN modifiées comme indiqué ci-dessus ou encore des séquences d'ADN homologues telles que définies ci-dessus, on peut utiliser les techniques connues de l'homme du métier et notamment celles décrites dans l'ouvrage de Sambrook, J. Fritsh, E. F. & Maniatis, T. (1989) intitulé: 'Molecular cloning : a laboratory manual', Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

Les séquences d'ADN homologues telles que définies ci-dessus peuvent notamment être isolées selon les méthodes connues de l'homme du métier par exemple par la technique de PCR en

utilisant des amorces nucléotidiques dégénérées pour amplifier ces ADN à partir de banques génomiques ou de banques d'ADNc des mycètes correspondants. Les ADNc peuvent également être préparés à partir de mARN isolés de mycètes

5 d'espèces différentes étudiées dans le cadre de la présente invention telles que *Candida albicans* mais par exemple et tout aussi bien : *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida quillermondii*, *Candida glabrata*, *Candida lusianiae* ou *Candida rugosa* ou encore des mycètes telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou encore des mycètes du type *Aspergillus* ou *Cryptococcus* et notamment, par exemple, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliens* and *Sporothrix schenckii* ou encore des mycètes des classes des phycomycètes or eumycètes en particulier les sous-classes de basidiomycètes, ascomycètes, mehiascomycétales (levure) and plectascales, gymnascales (champignon de la peau et des cheveux) ou de la classe des

20 hyphomycètes, notamment les sous-classes conidiosporales and thallosporales parmi lesquels les espèces suivantes : *mucor*, *rhizopus*, *coccidioides*, *paracoccidioides* (*blastomyces*, *brasiliensis*), *endomyces* (*blastomyces*), *aspergillus*, *menisci-lum* (*scopulariopsis*), *trichophyton* (*ctenomyces*), *epidermophton*, *microsporon*, *piedraia*, *hormodendron*, *phialophora*, *sporotrichon*, *cryptococcus*, *candida*, *geotrichum*, *trichosporon* ou encore *toropsulosis*.

Les polynucléotides de la présente invention peuvent ainsi être obtenus en utilisant les méthodes usuelles de

30 clonage et de criblage telles que celles de clonage et séquençage à partir de fragments d'ADN chromosomique extraits de cellules. Par exemple, pour obtenir les polynucléotides de la présente invention, on peut partir d'une banque de fragments d'ADN chromosomique. On peut préparer une sonde

35 correspondant à un oligonucléotide marqué par un élément radioactif, constituée de préférence de 17 nucléotides ou plus et dérivée d'une séquence partielle. Les clones contenant un ADN identique à celui de la sonde peuvent être

ainsi identifiés sous des conditions stringentes. Par le séquençage de clones individuels ainsi identifiés, en utilisant des primers de séquençage issus de la séquence d'origine, il est alors possible de prolonger la séquence 5 dans les deux directions pour déterminer la séquence du gène complet. De façon usuelle et efficace, un tel séquençage peut être réalisé en utilisant un ADN double brin dénaturé préparé à partir d'un plasmide. De telles techniques sont décrites par Maniatis, T. Fritsch, E.F. et Sambrook comme indiqué ci- 10 dessus. (Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York (1989) (notamment en 1.90 et 13.70 dans les chapitres de screening par hybridation et séquençage à partir de ADN double brin dénaturé).

Dans le cadre de la présente invention, on pourrait 15 notamment utiliser une banque de fragments d'ADN chromosomique de *Candida albicans* comme indiqué ci-après à l'exemple 1 dans la partie expérimentale.

Une description détaillée des conditions opératoires dans lesquelles a été réalisée la présente invention est 20 donnée ci-après.

L'invention a tout particulièrement pour objet le polypeptide ayant la fonction de facteur de transcription CATFIIIA et ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°3 codée par la séquence d'ADN telle que définie ci-dessus et 25 les analogues de ce polypeptide.

Par analogues de polypeptides, on entend les polypeptides dont la séquence d'acides aminés a été modifiée par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés mais qui conservent la même fonction biologique. De 30 tels polypeptides analogues peuvent être produits spontanément ou peuvent être produits par modification post-transcriptionnelle ou encore par modification de la séquence ADN de la présente invention comme indiqué ci-dessus, en utilisant les techniques connues de l'homme du métier : parmi 35 ces techniques, on peut citer notamment la technique de mutagénèse dirigée connue de l'homme du métier (Kramer, W., et al., *Nucl. Acids Res.*, 12, 9441 (1984) ; Kramer, W. and Fritz, H.J. , *Methods in Enzymology*, 154, 350 (1987) ;

Zoller, M.J. and Smith, M. Methods in Enzymology, 100, 468 (1983)).

La synthèse d'ADN modifiés peut être faite comme indiqué ci-dessus et notamment en utilisant des techniques de synthèse chimique bien connues telles que par exemple la méthode au phosphotriester [Letsinger, R.L and Ogilvie, K.K., K. Am. CHEM. Soc., 91, 3350 (1969) ; Merrifield, R.B., Sciences, 150, 178 (1968)] ou la méthode à la phosphoamidite [Beaucage, S.L and Caruthers, M .H., Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981) ; 10 McBRIDE, L.J. and Caruthers, M.H. Tetrahedron Lett., 24 245 (1983)] ou encore par la combinaison de ces méthodes.

Les polypeptides de la présente invention peuvent donc être préparés par les techniques connues de l'homme du métier, notamment partiellement par synthèse chimique ou 15 encore par la technique de l'ADN recombinant par expression dans une cellule hôte procaryote ou eucaryote comme indiqué ci-après.

La présente invention a particulièrement pour objet le procédé de préparation de la protéine recombinante CATFIIIA 20 ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°3 comprenant l'expression de la séquence d'ADN telle que définie ci-dessus dans un hôte approprié puis l'isolement et la purification de ladite protéine recombinante.

Pour produire le polypeptide de la présente invention, 25 on peut notamment utiliser les techniques de l'ADN recombinant en utilisant les méthodes de génie génétique et de culture cellulaire connues de l'homme du métier. On peut ainsi procéder par les étapes suivantes : d'abord préparation du gène approprié, puis incorporation de ce gène dans un 30 vecteur, transfert du vecteur porteur du gène dans une cellule hôte appropriée, production du polypeptide par expression du gène, isolement du polypeptide, le polypeptide ainsi produit pouvant être ensuite purifié.

Les polypeptides de la présente invention obtenus par 35 l'expression des polynucléotides de la présente invention peuvent être purifiés à partir de cultures de cellules transformées par les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que précipitation au sulfate d'ammonium ou à

l'éthanol, extraction en conditions acides, chromatographie échangeuse d'anions ou de cations, chromatographie d'interaction hydrophobique, chromatographie d'affinité, chromatographie à l'hydroxylapatite et la chromatographie à haute performance liquide (HPLC). Des techniques bien connues de l'homme du métier peuvent être utilisées pour régénérer la protéine lorsque celle-ci est dénaturée durant son isolement ou sa purification.

Les séquences d'ADN selon la présente invention et notamment SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 peuvent être préparées selon les techniques connues de l'homme du métier notamment par synthèse chimique ou par criblage d'une banque génomique ou d'une banque d'ADNc à l'aide de sondes d'oligonucléotides de synthèse par les techniques connues d'hybridation, ainsi amplification d'ADN à partir de fragments isolés ou encore par réverse transcriptase à partir d'ARN messager (ARNm). L'avantage de la technique comprenant d'abord l'isolement d'ARNm par extraction des ARN totaux puis la synthèse d'ADNc à partir de ces ARNm par réverse transcriptase réside notamment dans le fait que l'ARNm ne contient pas les introns alors que ces séquences non codantes sont présentes dans l'ADN génomique.

On peut procéder en utilisant les techniques usuelles de clonage connues de l'homme du métier et notamment décrites dans l'ouvrage de Sambrook, J. Fritsh, E. F. S Maniatis, T. (1989) intitulé: 'Molecular cloning : a laboratory manual', Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

Dans ces techniques, on peut procéder au clonage par insertion de fragment dans un plasmide qui peut être fourni avec un kit commercial adapté puis transformation d'une souche bactérienne par le plasmide ainsi obtenu. On peut utiliser notamment la souche E. coli XL1 Blue ou DH5 alpha. Les clones peuvent ensuite être cultivés pour extraire l'ADN plasmidique selon les techniques classiques de l'homme du métier référencées ci-dessus (Sambrook, Fritsh et Maniatis). On peut procéder au séquençage de l'ADN du fragment amplifié contenu dans l'ADN plasmidique.

Les polypeptides de la présente invention peuvent être

obtenus par expression dans une cellule hôte contenant un polynucléotide selon la présente invention et notamment une séquence d'ADN codant pour un polypeptide de la présente invention précédée d'une séquence promoteur convenable. La 5 cellule hôte peut être une cellule procaryote, par exemple *E. coli* ou une cellule eucaryote telle que les levures comme par exemple les ascomycètes parmi lesquels les *saccharomyces* ou encore des cellules de mammifères comme par exemple des cellule Cos.

10 La présente invention a particulièrement pour objet le vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus.

Dans le vecteur d'expression, une telle séquence d'ADN est donc ainsi notamment la séquence d'ADN du gène *CAtfIIIA* 15 codant pour une protéine ayant la fonction biologique du facteur de transcription de *Candida albicans* *CATfIIIA* et contenant la séquence de nucléotides SEQ ID N°1 .

Dans le vecteur d'expression, une telle séquence d'ADN est ainsi plus particulièrement la séquence d'ADN commençant au 20 nucléotide 720 et se terminant au nucléotide 1955 de SEQ ID N°1 .

Dans le vecteur d'expression, une telle séquence d'ADN est ainsi encore plus particulièrement celle du gène *CAtfIIIA* tel que défini ci-dessus codant pour la séquence d'acides aminés 25 SEQ ID N°3 .

Dans le vecteur d'expression, une telle séquence d'ADN est ainsi une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus codant pour le facteur de transcription *CATfIIIA* ainsi que les séquences d'ADN qui hybrident avec celle-ci et/ou présentent 30 des homologies significatives avec cette séquence ou des fragments de celle-ci ou encore les séquences d'ADN comprenant des modifications introduites par suppression, insertion et/ou substitution d'au moins un nucléotide codant pour une protéine ayant la même activité biologique que le 35 facteur de transcription *CATfIIIA*.

Dans le vecteur d'expression, une telle séquence d'ADN est notamment une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus ainsi que les séquences d'ADN similaires qui ont une

homologie de séquence nucléotidique d'au moins 50 % ou au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec ladite séquence d'ADN ou encore les séquences d'ADN similaires qui codent pour une protéine dont la séquence en AA a une 5 homologie d'au moins 40 % et notamment de 45 % ou d'au moins 50 %, plutôt au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec la séquence en AA codée par ladite séquence d'ADN. Les vecteurs d'expression sont des vecteurs permettant 10 l'expression de la protéine sous le contrôle d'un promoteur convenable. Un tel vecteur peut être un plasmide, un cosmid ou un ADN viral. Pour les cellules procaryotes, le promoteur peut être par exemple le promoteur lac, le promoteur trp, le promoteur tac, le promoteur  $\beta$ -lactamase ou le promoteur PL. Pour les cellules de levure, le promoteur peut être par 15 exemple le promoteur PGK ou le promoteur GAL. Pour les cellules de mammifères, le promoteur peut être par exemple le promoteur SV40 ou les promoteurs de l'adénovirus.

Des vecteurs type Baculovirus peuvent être aussi utilisés pour l'expression dans des cellules d'insectes. 20 Les cellules hôtes sont par exemple des cellules procaryotes ou des cellules eucaryotes. Les cellules procaryotes sont par exemple *E. coli*, *Bacillus* ou *Streptomyces*. Les cellules hôtes eucaryotes comprennent des levures ainsi que des cellules d'organismes supérieurs, par exemple des cellules de mammifères 25 ou des cellules d'insectes. Les cellules de mammifères sont par exemple des fibroblastes tels que des cellules CHO ou BHK de hamster et des cellules Cos de singe. Les cellules d'insectes sont par exemple des cellules SF9.

La présente invention concerne donc un procédé qui 30 comprend l'expression d'un polynucléotide selon la présente invention codant pour la protéine CATFIIIA dans une cellule hôte transformée par un polynucléotide selon la présente invention et notamment une séquence d'ADN codant pour la séquence en acides aminés SEQ ID N°3. Dans la réalisation 35 d'un tel procédé, la cellule hôte est notamment une cellule eucaryote.

Pour la réalisation de la présente invention, les vecteurs utilisés peuvent être par exemple pGEX ou pBAD et la cellule

hôte peut être *E. coli* ou par exemple le vecteur pYX222 et la cellule hôte peut être notamment *Saccharomyces cerevisiae*.

La présente invention a notamment pour objet la cellule hôte transformée avec un vecteur tel que défini ci-dessus et 5 renfermant une séquence d'ADN selon la présente invention.

La présente invention a ainsi pour objet le procédé de préparation d'une protéine recombinante selon la présente invention, tel que défini ci-dessus, dans lequel la cellule hôte est *E. coli* DH5 alpha ou *E. coli* XL1-Blue ou notamment 10 *Saccharomyces cerevisiae*.

Un exposé détaillé des conditions dans lesquelles peuvent être menées les opérations indiquées ci-dessus est donné ci-après dans la partie expérimentale. On a ainsi obtenu un 15 plasmide dans lequel est inséré le gène de la présente invention et on obtient ainsi également ce plasmide introduit dans une cellule hôte en opérant selon les techniques usuelles connues de l'homme du métier.

La présente invention a très précisément pour objet le plasmide déposé à la CNCM sous le numéro I-2072.

20 Il s'agit ainsi précisément de la souche XL1-Blue/Yep24-Catfc2 renfermant le gène CAtfIIIA selon la présente invention.

Ce gène correspond donc à la séquence 720-1955 de SEQ ID N°1.

25 Les conditions opératoires dans lesquelles a été réalisée la présente invention sont décrites ci-après dans la partie expérimentale.

La protéine TFIIIA codée par le gène CAtfIIIA est donc 30 un facteur de transcription. En effet, la protéine TFIIIA codée par le gène de la présente invention a un rôle biologique comme protéine se liant à l'ADN et serait utile comme facteur de transcription.

En particulier, le gène de la présente invention est exprimé dans différents tissus et joue un rôle important dans 35 l'initiation de la transcription du gène de l'ARN ribosomal 5S.

L'étude de ces facteurs peut également être utile dans l'analyse des mécanismes de régulation de la transcription.

La présente invention a ainsi pour objet un procédé de criblage de produits antifongiques caractérisé en ce qu'il comprend une étape où l'on mesure l'activité de facteur de transcription de CATFIIIA tel que défini ci-dessus en 5 présence de chacun des produits dont on souhaite déterminer les propriétés antifongiques et l'on sélectionne les produits ayant un effet inhibiteur sur cette activité.

La mise en évidence dans le cadre de la présente invention de l'homologie fonctionnelle des facteurs de 10 transcription de *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*, illustrée dans la partie expérimentale ci-après, permet d'envisager de nombreuses applications pour le facteur de transcription CATFIIIA de la présente invention.

En particulier du fait qu'il apparaît que l'activité de 15 SCTFIIIA est essentielle pour la survie cellulaire, des substances inhibitrices de cette activité peuvent être utilisables comme agents antifongiques, soit en tant que médicaments soit sur le plan industriel.

Par exemple, pour cibler des substances antifongiques telles 20 que des substances actives sur *Candida albicans*, on mesure l'activité de CATFIIIA ou de l'un de ses homologues fonctionnels constitué par un facteur de transcription TFIIIA en présence de chacun des produits dont on souhaite déterminer les propriétés antifongiques et l'on sélectionne 25 les produits ayant un effet inhibiteur sur cette activité.

On peut effectuer un tel criblage en mesurant l'activité de transcription de TFIIIA en présence d'activateurs ou d'inhibiteurs potentiels à tester. La transcription de l'ARN 5S peut par exemple être mesurée *in vitro* directement en 30 détectant la synthèse de l'ARN 5S dans un milieu réactionnel approprié.

L'activité de transcription peut également être mesurée *in vivo* par un test de viabilité cellulaire. Par exemple, 35 l'activité de transcription peut être avantageusement mesurée dans des cellules d'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* n'exprimant pas TFIIIA de SC transformées par le gène CAtfIIIA.

L'invention englobe également l'utilisation d'un produit

sélectionné comme indiqué ci-dessus pour ses propriétés inhibitrices d'un facteur de transcription TFIIIA pour l'obtention d'un agent antifongique.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide de la 5 partie expérimentale qui suit et qui décrit le clonage du gène CAtfIIIA de la présente invention.

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation d'un produit sélectionné par le procédé de criblage de produits antifongiques tel que défini ci-dessus pour 10 l'obtention d'un agent antifongique.

La présente invention a également pour objet l'utilisation du gène du facteur de transcription CAtfIIIA de *Candida albicans* ou du facteur de transcription codé par ce gène tel que défini ci-dessus pour la sélection d'un produit 15 ayant des propriétés antifongiques tel que défini ci-dessus et utilisé comme inhibiteur du facteur de transcription de *Candida albicans*.

La présente invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe 20 actif au moins un inhibiteur du facteur de transcription de *Candida albicans* telles que définies ci-dessus.

De telles compositions peuvent notamment être utiles pour traiter les infections fongiques topiques et systémiques.

Les compositions pharmaceutiques indiquées ci-dessus peuvent 25 être administrées par voie buccale, rectale, par voie parentérale ou par voie locale en application topique sur la peau et les muqueuses ou par injection par voie intraveineuse ou intramusculaire. Ces compositions peuvent être solides ou liquides et se présenter sous toutes les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine comme, par exemple, les comprimés simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les suppositoires, les préparations injectables, les pommades, les crèmes, les gels et les préparations en aérosols ; elles sont préparées selon les

30 méthodes usuelles. Le principe actif peut y être incorporé à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de 35

cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

5 La posologie sera variable selon le produit utilisé, le sujet traité et l'affection en cause.

La présente invention a ainsi notamment pour objet l'utilisation des compositions telles que définies ci-dessus comme agents antifongiques.

10 La présente invention a encore pour objet une méthode d'induction d'une réponse immunologique chez un mammifère comprenant l'inoculation à ce mammifère du polypeptide selon la présente invention tel que défini ci-dessus ou un fragment de ce polypeptide ayant la même fonction de façon à produire 15 un anticorps permettant de protéger l'animal contre la maladie.

La présente invention a ainsi pour objet des anticorps dirigés contre les polypeptides de la présente invention tels que définis ci-dessus ayant la fonction de facteur de transcription CATFIIIA ou contre un fragment de ces polypeptides ayant la même fonction et codés par les polynucléotides de la présente invention et notamment par une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus.

Les polypeptides de la présente invention peuvent ainsi être 25 utilisés comme immunogènes pour produire des anticorps immunospécifiques de ces polypeptides. Le terme anticorps utilisé désigne les anticorps aussi bien monoclonaux que polyclonaux, chimériques, simple chaîne, les anticorps non humains et les anticorps humains, aussi bien que les 30 fragments Fab, incluant ainsi les produits d'une banque d'immunoglobuline Fab. Les anticorps générés contre les polypeptides de la présente invention peuvent être obtenus par administration des polypeptides de la présente invention ou de fragments portant des épitopes, leurs analogues ou 35 encore des cellules à un animal, de préférence non humain, en utilisant des protocoles de routine pour la préparation d'anticorps monoclonaux. De tels anticorps peuvent être préparés par les méthodes bien connues dans ce domaine telles

que celles décrites dans l'ouvrage *Antibodies, Laboratory* manuel Ed. Harbow et David Larre, Cold Spring Harbor laboratory Eds, 1988.

La présente invention a ainsi tout particulièrement pour 5 objet un anticorps dirigé contre la protéine CATFIIIA de la présente invention ou un fragment de cette protéine ayant notamment la même fonction.

La présente invention a encore pour objet l'utilisation du gène du facteur de transcription CAtfIIIA ou du facteur de 10 transcription codé par ce gène tel que défini ci-dessus pour la préparation de compositions utiles pour le diagnostic ou le traitement de maladies causées par la levure pathogène *Candida albicans*.

La présente invention concerne aussi l'utilisation des 15 polynucléotides de la présente invention comme réactifs de diagnostic. La détection d'un polynucléotide selon la présente invention codant pour la protéine TFIIIA de *Candida albicans* ou de ses analogues chez un eucaryote en particulier un mammifère et plus particulièrement un être humain, peut 20 constituer un moyen de diagnostic d'une maladie : ainsi, on peut détecter un tel polynucléotide selon la présente invention et notamment une séquence d'ADN par une grande variété de techniques chez un eucaryote en particulier un mammifère et plus particulièrement un être humain, infectés 25 par un organisme contenant au moins l'un des polynucléotides de la présente invention. Les acides nucléiques pour une telle utilisation d'outil de diagnostic peuvent être détectés à partir de cellules ou de tissus infectés, tels que l'os, le sang, le muscle, le cartilage ou la peau. Pour cette 30 détection, l'ADN génomique peut être utilisé directement ou encore être amplifié par PCR ou une autre technique d'amplification. Les ARN ou ADN et ADNc peuvent également être utilisés dans le même but. Par les techniques d'amplification, la lignée du mycète présent dans un 35 eucaryote en particulier un mammifère et plus particulièrement un être humain, peut être caractérisée par l'analyse du génotype. Des délétions ou des insertions peuvent être détectées par le changement de taille du produit amplifié par

comparaison avec le génotype de la séquence de référence. Les points de mutations peuvent être identifiés par hybridation de l'ADN amplifié avec les séquences, marquées par un élément radioactif, de polynucléotides de la présente invention. Des 5 séquences parfaitement complémentaires peuvent ainsi être distinguées de duplex qui résistent mal à la digestion par des nucléases. Les différences de séquences d'ADN peuvent aussi être détectées par des altérations de la mobilité électrophorétique de fragments d'ADN dans des gels, avec ou 10 sans agent dénaturant, ou par un séquençage direct d'ADN (référence : Myers et al. *Science*, 230 : 1242 (1985)). Des changements de séquences à des localisations spécifiques peuvent aussi être révélées par des expériences de protection contre des nucléases telles que RNase I et S1 ou par des 15 méthodes de clivage chimique (référence : Cotton et al., *Proc Natl Acad Sci, USA*, 85 : 4397-4401 (1985)). Des cellules contenant l'un des polynucléotides de la présente invention portant des mutations ou des polymorphismes peuvent aussi être détectées par un grand nombre de 20 techniques permettant notamment de déterminer le sérotype. Par exemple, la technique RT-PCR peut être utilisée pour détecter les mutations. Il est particulièrement préféré d'utiliser les techniques de RT-PCR en conjonction avec des systèmes de détection automatique, tels que par exemple dans 25 la technique GeneScan. ARN et ADNC peuvent être utilisés dans les techniques PCR ou RT-PCR. Par exemple, des amorces complémentaires des polynucléotides codant pour les polypeptides de la présente invention peuvent être utilisés pour identifier et analyser les mutations.

30 Des amorces peuvent ainsi être utilisées pour amplifier un ADN isolé de l'individu infecté. De cette façon des mutations dans la séquence d'ADN peuvent être détectées et utilisées pour diagnostiquer l'infection et déterminer le sérotype ou le classement de l'agent infectieux. De telles techniques 35 sont usuelles pour l'homme du métier et sont décrites notamment dans le manuel *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al, ed. John Wiley & sons, Inc., 1995).

La présente invention concerne ainsi un procédé de

diagnostic d'une maladie et de préférence d'une infection fongique provoquée notamment par *Candida albicans* telles que des mycoses comme indiqué ci-dessus, ce procédé comprenant la détermination à partir d'un échantillon prélevé sur un individu infecté, d'une augmentation de la quantité de polynucléotide de la présente invention. Un tel polynucléotide peut notamment avoir une séquence d'ADN de la présente invention telle que définie ci-dessus.

Des augmentations ou des diminutions de la quantité de polynucléotides peuvent être mesurées par les techniques bien connues de l'homme du métier telles que notamment l'amplification, la PCR, RT PCR, Northern blotting ou autres techniques d'hybridation.

De plus, une méthode de diagnostic en accord avec la présente invention consiste en la détection d'une expression trop importante de polypeptides de la présente invention, par comparaison avec des échantillons de contrôle constitués de tissus normaux non infectés utilisés pour détecter la présence d'une infection.

Les techniques qui peuvent être utilisées pour détecter ainsi les quantités de protéines exprimées dans un échantillon d'une cellule hôte sont bien connues de l'homme du métier. On peut ainsi citer par exemple les techniques de radioimmunoassay ou de competitive-binding, analyse par Western Blot et test ELISA (ref Ausubel indiqué ci-dessus).

La présente invention a encore pour objet un kit pour le diagnostic d'infections fongiques comprenant une séquence d'ADN selon la présente invention telle que définie ci-dessus ou une séquence similaire ou un fragment de cette séquence, le polypeptide codé par cette séquence ou un fragment polypeptidique ayant la même fonction ou un anticorps dirigé contre un tel polypeptide codé par cette séquence d'ADN ou contre un fragment de ce polypeptide.

Ce kit pourra ainsi contenir une séquence d'ADN selon la présente invention telle que définie ci-dessus et par exemple la séquence d'ADN SEQ ID N°1 ou un fragment de cette séquence ou encore la séquence 720 à 1955 de SEQ ID N°1.

Un tel kit pourra de même contenir un polypeptide selon la

présente invention ou un fragment de ce polypeptide et notamment la protéine ayant la séquence en AA SEQ ID N°3 ou encore un anticorps tel que défini ci-dessus.

Un tel kit peut-être préparé selon les méthodes bien connues 5 de l'homme du métier.

Les séquences SEQ ID N° 1 à 9 indiquées dans la présente invention sont décrites ci-après.

La partie expérimentale ci-après permet de décrire la présente invention sans toutefois la limiter.

10 Partie expérimentale

**Exemple 1 : Clonage et séquençage du gène CAtfIIIA**

a) Conditions de culture :

La bactéries Escherichia coli (E. coli) de la lignée DH5 alpha (Gibco BRL) ou XL1- Blue type K12 (Stratagène) a été 15 utilisée pour la préparation des plasmides de la présente invention.

La croissance de cette bactéries a été effectuée selon les conditions usuelles en milieu liquide LB qui renferme 10g de bactotryptone, 5g d'extrait de levure et 10 g de NaCl pour un 20 litre d'eau et qui renferme également 100 microg/ml d'ampicilline (SIGMA).

La colonie a été prélevée sur milieu solide LB + agar + ampicilline puis cultivée dans 100 ml de milieu LB et incubée jusqu'à DO (600nm) = 0.8.

25 L'incubation a été effectuée à 37°C sous atmosphère normale et agitation à 225 rpm.

La viabilité de la souche est vérifiée lorsque la souche pousse sur milieu LB + ampicilline à 100 microg/ml.

On peut noter qu'un gène de résistance à l'ampicilline Bla 30 fait partie du vecteur dans lequel sont clonés les fragments de CAtfIIIA. Ainsi, la sélection des souches renfermant les plasmides contenant le gène tfIIIA de Candida albicans de la présente invention peut être opérée par la culture des souches dans ce milieu renfermant de l'ampicilline (100 35 microg/ml), un tel milieu permettant la survie uniquement des souches qui renferment le gène de résistance à l'ampicilline et ainsi uniquement des souches qui renferment le gène tfIIIA de Candida a. de la présente invention.

Pour la conservation des souches obtenues, 15 % de glycérol sont ajoutés au milieu de culture : les cultures sont donc conservées dans le milieu de suspension LB +100 microgrammes/ml d'ampicilline + 15 % de glycérol à la concentration

5 bactérienne de DO (600nm = 0.8 sous forme d'aliquots en cryotubes de 1ml par tube.

Pour le séquençage, l'ADN plasmidique de plusieurs bactéries issues de chacun des clonages indiqués ci-après est préparé en utilisant un kit commercial (Qiagen Plasmids kit). Les 10 fragments correspondant à la séquence du gène CAtfIIIA sont séquencés sur les deux brins suivant les techniques classiques connues de l'homme du métier (utilisation du séquenceur ABI 377 XL, Perkin Elmer).

**b) Clonage et séquençage du gène CAtfIIIA**

15 Dans le cadre de la présente invention, le gène codant pour le facteur de transcription de CA soit SEQ ID N°1 représenté à la figure 1 a été isolé à partir de la banque de fragment génomique de *Candida albicans*. (Sanglard et al., *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39, 2378-2386, (1995)).

20 La structure du gène a été identifiée par séquençage.

La stratégie utilisée repose sur l'hypothèse que SC et CA sont des levures proches dont la structure des gènes peut être homologue.

On a procédé comme suit :

25 Dans le cadre de la présente invention, en utilisant le site internet de Standford qui permet d'accéder aux séquences préliminaires du génome de *Candida albicans*, une fraction de séquence homologue à tfIIIA de *S. cerevisiae* a été identifiée. Ce fragment contient un cadre ouvert de lecture 30 (258 pb) codant pour une protéine pour laquelle on peut identifier deux motifs en doigts de zinc et une région riche en résidus sérine caractéristique du facteur TFIIIA de SC. Ce cadre ouvert de lecture contient en réalité 259 nucléotides. Afin d'amplifier le fragment correspondant de *Candida* 35 *albicans*, deux oligonucléotides ont été sélectionnés dans cette séquence. Ces oligonucléotides sont les suivants : INT CAND situé à la position 720-740 de SEQ ID N°1 et nommé SEQ ID N°4 et

3' CAND situé à la position 955-978 de SEQ ID N°1 et nommé SEQ ID N°5.

On a ainsi obtenu un fragment de 259 paires de bases.

Il a d'abord été confirmé par PCR qu'il est possible

5 d'amplifier un fragment d'ADN génomique de CA, préparé à partir de cellules de CA par les méthodes usuelles connues de l'homme du métier, et d'autre part dans la banque de gènes de CA. Ces oligonucléotides ont aussi permis de synthétiser un fragment d'ADN à partir d'ADN génomique de *Candida albicans* 10 afin de préparer une sonde marquée au 32P (phosphore 32) en utilisant un kit (Mega Prime, Amersham).

Ce fragment a été utilisé pour le criblage de la banque de fragments génomiques Sau 3A de *Candida albicans* clonés dans le site BamHI du vecteur YEp24 (multicopie-Ura3) [Botstein et 15 al., *Gene*, 8, 17-24, (1979)].

Les cellules *E. coli* DH5 alpha transformées avec le vecteur YEp24 (vecteur multicopie avec gène de sélection URA3) contenant les fragments décrits ci-dessus (17000 clones) sont étalées sur des boîtes contenant un milieu LB + ampicilline 20 et cultivées à 37°C.

Une réplique sur filtre de nitrocellulose est ensuite traitée par des techniques connues de l'homme du métier comme par exemple NaOH : 0,5M, 5 minutes ; Tris-HCl : 1M (pH = 7,5) 5 minutes ; NaCl 1,5M/Tris-HCl 0,5M (pH 7,5).

25 Pour le séchage, les filtres sont gardés pendant 10 minutes à 80°C puis fixés aux UV (Stratalinker). Préhybridation et hybridation sont réalisées dans un tampon de NaPO4 (pH 7,2) 0,5M ; EDTA 10mM ; SDS 7 % (réf., Church et Gilbert, PNAS 81 : 1991 (1984)).

30 La sonde est marquée au 32P avec le kit MegaPrime et (alpha 32P)dCTP (Amersham UK). L'hybridation est réalisée pendant toute la nuit à 65°C. Les filtres sont ensuite lavés dans 1 % SDS, 40 mM NaPO4 (pH 7,2), six fois pendant 5 minutes à 65°C et ils sont ensuite soumis à une autoradiographie pendant 35 toute la nuit.

L'hybridation sur filtre avec la sonde marquée au 32P a permis de sélectionner plusieurs clones positifs qui ont été réensemencés sur boîtes afin de les isoler. Des clones

On a ainsi obtenu trois types de clones que l'on nomme 9, 18 et 47 contenant trois inserts différents du gène CAtfIIIA de la présente invention : l'analyse par PCR a confirmé la présence du fragment de 259 pb.

5 Les plasmides YEp24 contenant des inserts de *Candida albicans* ont été récupérés à partir de ces colonies. La carte de restriction de chacun de ces plasmides a été établie, et a permis de constater que tous les inserts provenaient d'une même région du génome de *Candida albicans*. Pour le séquençage 10 de cette région on a utilisé les oligonucléotides suivants : INT-Cand situé à la position : 720-740 de SEQ ID N°1 et nommé SEQ ID N°4  
3'-Cand situé à la position : 955-978 de SEQ ID N°1 et nommé SEQ ID N°5

15 Cont-Int situé à la position : 719-741 de SEQ ID N°1 et nommé SEQ ID N°6  
Can-Kor1 situé à la position 1365-1389 de SEQ ID N°1 et nommé SEQ ID N°7  
et le séquenceur ABI 377 XL (Perkin Elmer). Le séquençage de 20 cette région a permis de mettre en évidence les points suivants :  
1) Les trois clones contiennent tous seulement un cadre de lecture ouvert, ininterrompu de 1236 pb avec la même séquence qui code pour une protéine.

25 2) Le cadre de lecture ouvert code pour une protéine de 412 AA qui montre une homologie importante avec le facteur TFIIIA de *Saccharomyces cerevisiae*. L'analyse de la protéine permet de retrouver les 9 motifs en doigt de zinc qui sont caractéristiques du facteur de transcription TFIIIA. La 30 comparaison des séquences protéique de CATFIIIA et TFIIIA de SC, permet de mettre en évidence une similarité de 50 % et une identité de 45 %. Pour la traduction en acides aminés il a été tenu compte du fait que dans *Candida albicans* le codon CTG est traduit en Sérine et qu'il y a 2 codons CTG dans 35 *Candida albicans* TFIIIA.

On peut noter :

- La conservation de la région riche en Sérine dans la partie N-terminale

- la présence d'une très longue région intermédiaire entre les doigts de zinc 8 et 9 caractéristique de SC.

Les différences de séquence entre les protéines TFIIIA de SC et TFIIIA de *Candida albicans* se situent dans la partie C-5 terminale en dehors des motifs en doigt de zinc.

Le plasmide YEp24 contenant la région promotrice et la séquence codante pour CATFIIIA a été transformé dans la souche *E. Coli* XL1 Blue puis déposé sous le numéro I-2072 à la CNCM, Institut Pasteur 25 rue de Docteur ROUX 75015 Paris, 10 le 15 septembre 1998.

**Exemple 2 : expression du gène tfIIIA**

Un fragment contenu dans le clone 9 a été amplifié par PCR en utilisant des amorces contenant les séquences reconnues par les enzymes de restriction EcoRI et XhoI et s'hybridant au 15 gène tfC2, les amorces sont les suivantes :

5'-EcoTF situé à la position 720-732 de SEQ ID N°1 et nommé SEQ ID N°8 et

3'-XhoI situé à la position 1946-1960 de SEQ ID N°1 et nommé SEQ ID N°9.

20 On procède donc à une amplification par PCR de l'ADN génomique de la façon suivante :

0,5 microgrammes d'ADN du clone 9 sont ajoutés à 50 microlitres d'une solution réactionnelle contenant 200 nanogrammes/ml de chaque dNTP, les primers indiqués ci-dessus à raison de 25 micromoles/l pour chacun, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x Pfu Buffer, 5U Pfu polymérase (Perkin Elmer).

Le milieu réactionnel est soumis à 30 cycles PCR correspondant chacun à 94°C pendant 30 secondes, puis à 60°C pendant 45 secondes puis à 72°C pendant 1 minute.

30 Le fragment contenant la séquence codante de CATFIIIA a été sous-cloné dans les vecteurs pYX122 (CEN, HIS 3) et pYX222 (2 micron, HIS3) (R et D System). Ce plasmide a été utilisé pour transformer des cellules de *Saccharomyces c.* YWRI (Mat alpha, can 1-100, his 3-11, leu 2-3, 112 trp 1-1, ura 3-1, 35 ade 2-1, tfC2 :: leu2 + pJA230), (Camier et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 92 9338-9342, 1995).

La souche transformée selon les mêmes méthodes que celles indiquées ci-dessus permet l'expression du facteur de transcription TFIIIA de *Candida albicans* contenant un tag HA. Conclusion

- 5 Les réalisations expérimentales indiquées ci-dessus montrent donc les points suivants :
  - 1) Le gène du facteur TFIIIA de *Candida albicans* a été isolé dans trois clones 9, 18 et 47 obtenus comme indiqué ci-dessus à l'exemple 1 à partir de la banque de gènes de *Candida albicans* en utilisant une technique d'hybridation. La structure de ce gène a été identifiée par séquençage.
  - 2) La protéine CATFIIIA du gène CAtfIIIA obtenue à l'exemple 1 est constituée de 412 AA et montre une forte homologie avec le facteur TFIIIA de SC. Cette protéine contient une région riche en résidus SER dans la partie N-terminale et 9 doigts de zinc dont la disposition est identique à celle de la protéine TFIIIA de SC.
  - 3) Le sous-clonage du gène du facteur TFIIIA de *Candida albicans* a été réalisé et le gène a été placé sous contrôle d'un promoteur de SC.

## REVENDICATIONS

- 1) Polynucléotide isolé contenant une séquence nucléotidique choisie dans le groupe suivant:
  - 5 a) un polynucléotide ayant au moins 50 % ou au moins 60% et de préférence au moins 70 % d'identité avec un polynucléotide codant pour un polypeptide ayant la fonction de facteur de transcription et ayant une séquence en acides aminés homologue de la séquence SEQ ID N°3.
  - 10 b) un polynucléotide complémentaire du polynucléotide a).
  - c) un polynucléotide comprenant au moins 15 bases consécutives du polynucléotide défini en a) et b).
- 2) Polynucléotide selon la revendication 1 tel que ce polynucléotide est un ADN.
- 15 3) Polynucléotide selon la revendication 1 tel que ce polynucléotide est un ARN.
- 4) Polynucléotide tel que défini à la revendication 2 comprenant la séquence de nucléotides SEQ ID N°1
- 5) Séquence d'ADN telle que définie aux revendications 1, 2
- 20 et 4 caractérisée en ce que cette séquence d'ADN est celle du gène CAtfIIIA codant pour une protéine ayant la fonction biologique du facteur de transcription de Candida Albicans CAtfIIIA et contenant la séquence de nucléotides SEQ ID N°1
- 6) Séquence d'ADN selon la revendication 5 ayant la séquence
- 25 commençant au nucléotide 720 et se terminant au nucléotide 1955 de SEQ ID N°1.
- 7) Séquence d'ADN du gène CAtfIIIA selon la revendication 5 ou 6 codant pour la séquence d'acides aminés SEQ ID N°3 (412 AA).
- 30 8) Séquence d'ADN codant pour le facteur de transcription CAtfIIIA selon les revendications 5 à 7 ainsi que les séquences d'ADN qui hybrident avec celle-ci et/ou présentent des homologies significatives avec cette séquence ou des fragments de celle-ci et ayant la même fonction.
- 35 9) Séquence d'ADN selon les revendications 5 à 8 comprenant des modifications introduites par suppression, insertion et/ou substitution d'au moins un nucléotide codant pour une

protéine ayant la même activité biologique que le facteur de transcription CATFIIIA.

10) Séquence d'ADN selon l'une des revendications 5 à 9 ainsi que les séquences d'ADN qui ont une homologie de séquence 5 nucléotidique d'au moins 50 % ou au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec ladite séquence d'ADN.

11) Séquence d'ADN selon l'une des revendications 5 à 10 ainsi que les séquences d'ADN qui codent pour une protéine de fonction similaire dont la séquence en AA a une homologie 10 d'au moins 40 % et notamment de 45 % ou d'au moins 50 %, plutôt au moins 60 % et de préférence au moins 70 % avec la séquence en AA codée par ladite séquence d'ADN.

12) Polypeptide ayant la fonction de facteur de transcription CATFIIIA et ayant la séquence d'acides aminés 15 SEQ ID N°3 codée par la séquence d'ADN selon l'une des revendications 5 à 11 et les analogues de ce polypeptide.

13) Procédé de préparation de la protéine recombinante CATFIIIA ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°3 comprenant l'expression de la séquence d'ADN selon l'une 20 des revendications 5 à 11 dans un hôte approprié puis l'isolement et la purification de ladite protéine recombinante.

14) Vecteur d'expression contenant la séquence d'ADN selon l'une des revendications 5 à 11.

25 15) Cellule hôte transformée avec un vecteur selon la revendication 14.

16) Procédé tel que défini à la revendication 13 dans lequel la cellule hôte est *E. coli* DH5 alpha ou *E. coli* XL1-Blue.

17) Procédé tel que défini à la revendication 13 dans 30 laquelle la cellule hôte est *Saccharomyces cerevisiae*.

(18) Plasmide déposé à la CNCM sous le numéro I-2072.

19) Procédé de criblage de produits antifongiques caractérisé en ce qu'il comprend une étape où l'on mesure l'activité de facteur de transcription de CATFIIIA tel que défini à la 35 revendication 12 en présence de chacun des produits dont on souhaite déterminer les propriétés antifongiques et l'on

sélectionne les produits ayant un effet inhibiteur sur cette activité.

20) Utilisation d'un produit sélectionné par le procédé selon la revendication 19 pour l'obtention d'un agent antifongique.

5 21) Utilisation du gène du facteur de transcription CAtfIIIA de *Candida albicans* ou du facteur de transcription codé par ce gène selon l'une des revendications 5 à 12 pour la sélection d'un produit ayant des propriétés antifongiques selon la revendication 19 comme inhibiteur du facteur de transcription de *Candida albicans*.

10 22) Compositions pharmaceutiques renfermant à titre de principe actif au moins un inhibiteur du facteur de transcription de *Candida albicans* tel que défini à la revendication 21.

15 23) Utilisation des compositions telles que définies à la revendication 22 comme agents antifongiques.

24) Méthode d'induction d'une réponse immunologique chez un mammifère comprenant l'inoculation à ce mammifère du polypeptide tel que défini à la revendication 12 ou un fragment de ce polypeptide ayant la même fonction de façon à produire un anticorps permettant de protéger l'animal contre la maladie.

25 25) Anticorps dirigé contre le polypeptide tel que défini à la revendication 12 ou un fragment de ce polypeptide ayant la même fonction.

26) Utilisation du gène CAtfIIIA ou du facteur de transcription codé par ce gène selon l'une des revendications 5 à 12 pour la préparation de compositions utiles pour le diagnostic ou le traitement de maladies causées par la levure pathogène *Candida albicans*.

27) Kit pour le diagnostic d'infections fongiques comprenant une séquence d'ADN tel que défini à l'une des revendications 5 à 11 ou une séquence ayant une fonction similaire ou un fragment fonctionnel de cette séquence, le polypeptide codé par cette séquence ou un fragment polypeptidique ayant la même fonction ou un anticorps dirigé contre un tel

polypeptide codé par cette séquence d'ADN ou contre un fragment de ce polypeptide.

## LISTAGE DE SEQUENCE

<110> Hoechst Marion Roussel  
<120> Gène tfIIIA de Candida albicans (CATfIIIA) et la protéine codée CATfIIIA.  
<130> BREVET 9824  
<140>  
<141>  
<160> 9  
<170> PatentIn Vers. 2.0  
<210> 1  
<211> 2060  
<212> ADN  
<213> Candida albicans  
<400> 1.  
ctttatttagg aagattggct aggccatttt gtattacggg tctccaaagt gcaattgttt 60  
tagtaaatat ccaatcattg ggcttcagtg tgaatggggg ttgtcaatct cttgggttag 120  
aaataggcgc aggccctccga atcccaaaaa aagaagaatc aggatgtctc ggctgcaaga 180  
ttttagcca tggcaaatgc cgaaaaatga aaaaaaaaaa aaagtctact gggcccacct 240  
acaaaaggaa aagtgattga actagatcag tagtggtctg gaccctctat aattttataa 300  
tattgtcacg ggctttagaa tttgtataat tgggtgtctg acactctgtg gttaatatct 360  
ggacatctcg ttccccttgt gaagggtcgt ctgtaatgaa ttcatgatca agaataatat 420  
gactttgtc acttcataga gtgccgactt gattatttt gagctttatc ctctgtataa 480  
tatcgtaacc acttgactta ttcccttgtt gtgggattca ctttggatga tgatgttaac 540  
caaatgtaat tggtacaatc cttttgtcc ttgtcgac ttccttaat atcgacactt 600  
atttcattaa tgagacgcaa cgcatcctc tctccataga aaaaaaaaaa aacaaactga 660  
aaaaataaaac agcggacctc atctctttt ttcaaattcca ctttttattta ctttattcaa 720  
tgagtgaaag tgacgaaacc aaatcgatat catcttaat atcttcttct tcttcatac 780  
gtccccaaaaa gtatattgc acatatgaag ggtgtataa agcctataat cgaccatcat 840  
tattagagca acatctaaga acccacagta atgatcgacc gtataatgt acagtggacg 900  
attgtgataa agcatttttc agaaaatcac atttggaaac acatattgtt tcacattccg 960  
aaaaaaaaacc attccattgt tcagtgttg gtaaagggtt taattctcgaa caacacttga 1020  
aaagacatga aatcacccat acaaagtcat ttaaatgtac atttggaaat tgcataagaag 1080  
catttataa acatcaatct ttaagacatc atatattatc tggatgttcaaa attagcacaa cataaattaa 1140  
cgtgtaaaca atgtaataaa gtttcactc gaccttcaaa attagcacaa cataaattaa 1200  
aacatcatgg tggatctcct gcttatcaat gtgatcatcc tggatgtttt aaaaatttcc 1260

aaacttggtc agtattacaa tttcatataa aacaactgca tccaaaactt aaatgtccta 1320  
 aatgtggtaa aggttgtt gggaaaaaag gtttatctc acatatgtta agtcatgatg 1380  
 attctaccat gatcaaaata tggacttgc attattgtga tgtggggaaa tttgcaaaga 1440  
 aaaatgaatt agtgaacat tataatatct tccatgatgg taatatccct gatgattat 1500  
 taaagggaaac tgaagtgaaa aaatttagaga acctattaga tcaaggatcg aaattaaata 1560  
 atttgcataa attagaaaca gagaaattaa aagtggaga agatgaagaa gatgaagaag 1620  
 atagtctaga tgaaaaaaga agtgcattt gatcagactc aatgtcagct caaagatcaa 1680  
 taaaatcatt tactgcttct ttggaaagggtt caaagagtgt ttctaaactt attctgaata 1740  
 gtggaaagaa gatcaattgt cctaagaata attgtgatag aatgtttct agagaatatg 1800  
 atttacgtcg acatttgcattt tggcatgatg ataatttaca aagaattttag tcattctaa 1860  
 atagtataga aaaagaagaa actccagaag gtgaaccatt ggttaaaaaa gccaggatgg 1920  
 atttattgcc aaatgaaaca tcagtgattt ctcgataata tacatttaaa attatattaa 1980  
 catttttatt tccttaatt tttttttt gtgggctttt tattttacat tatttaactt 2040  
 gacatattac tctcttaatg 2060

<210> 2  
 <211> 1239  
 <212> ADN  
 <213> Candida albicans

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1236)

<400> 2  
 atg agt gaa agt gac gaa acc aaa tcg ata tca tct tta ata tct tct 48  
 Met Ser Glu Ser Asp Glu Thr Lys Ser Ile Ser Ser Leu Ile Ser Ser  
 1 5 10 15

tct tct tca tca cgt ccc aaa aag tat att tgc aca tat gaa ggg tgt 96  
 Ser Ser Ser Arg Pro Lys Lys Tyr Ile Cys Thr Tyr Glu Gly Cys  
 20 25 30

gat aaa gcc tat aat cga cca tca tta tta gag caa cat tta aga acc 144  
 Asp Lys Ala Tyr Asn Arg Pro Ser Leu Leu Glu Gln His Leu Arg Thr  
 35 40 45

cac agt aat gat cga ccg tat aaa tgt aca gtg gac gat tgt gat aaa 192  
 His Ser Asn Asp Arg Pro Tyr Lys Cys Thr Val Asp Asp Cys Asp Lys  
 50 55 60

gca ttt ttc aga aaa tca cat ttg gaa aca cat att gta tca cat tcc 240  
 Ala Phe Phe Arg Lys Ser His Leu Glu Thr His Ile Val Ser His Ser  
 65 70 75 80

gaa aaa aaa cca ttc cat tgt tca gtg tgt ggt aaa ggg gtt aat tct 288  
 Glu Lys Lys Pro Phe His Cys Ser Val Cys Gly Lys Gly Val Asn Ser  
 85 90 95

cga caa cac ttg aaa aga cat gaa atc acc cat aca aag tca ttt aaa 336  
 Arg Gln His Leu Lys Arg His Glu Ile Thr His Thr Lys Ser Phe Lys

100	105	110	
tgt aca ttt gaa aat tgt caa gaa gca ttt tat aaa cat caa tct tta Cys Thr Phe Glu Asn Cys Gln Glu Ala Phe Tyr Lys His Gln Ser Leu 115 120 125 384			
aga cat cat ata tta tct gtt cat gaa aaa aca tta acg tgt aaa caa Arg His His Ile Leu Ser Val His Glu Lys Thr Leu Thr Cys Lys Gln 130 135 140 432			
tgt aat aaa gtt ttc act cga cct tca aaa tta gca caa cat aaa tta Cys Asn Lys Val Phe Thr Arg Pro Ser Lys Leu Ala Gln His Lys Leu 145 150 155 160 480			
aaa cat cat ggt gga tct cct gct tat caa tgt gat cat cct ggt tgt Lys His His Gly Gly Ser Pro Ala Tyr Gln Cys Asp His Pro Gly Cys 165 170 175 528			
ttt aaa aat ttc caa act tgg tca gta tta caa ttt cat ata aaa caa Phe Lys Asn Phe Gln Thr Trp Ser Val Leu Gln Phe His Ile Lys Gln 180 185 190 576			
ctg cat cca aaa ctt aaa tgt cct aaa tgt ggt aaa ggt tgt gtt ggg Ser His Pro Lys Leu Lys Cys Pro Lys Cys Gly Lys Gly Cys Val Gly 195 200 205 624			
aaa aaa ggt tta tct tca cat atg tta agt cat gat gat tct acc atg Lys Lys Gly Leu Ser Ser His Met Leu Ser His Asp Asp Ser Thr Met 210 215 220 672			
atc aaa ata tgg act tgt gat tat tgt gat gtg ggg aaa ttt gca aag Ile Lys Ile Trp Thr Cys Asp Tyr Cys Asp Val Gly Lys Phe Ala Lys 225 230 235 240 720			
aaa aat gaa tta gtt gaa cat tat aat atc ttc cat gat ggt aat atc Lys Asn Glu Leu Val Glu His Tyr Asn Ile Phe His Asp Gly Asn Ile 245 250 255 768			
cct gat gat tta tta aag gaa act gaa gtg aaa aaa tta gag aac cta Pro Asp Asp Leu Leu Lys Glu Thr Glu Val Lys Lys Leu Glu Asn Leu 260 265 270 816			
tta gat caa gga tcg aaa tta aat aat ttg cat gaa tta gaa aca gag Leu Asp Gln Gly Ser Lys Leu Asn Asn Leu His Glu Leu Glu Thr Glu 275 280 285 864			
aaa tta aaa gtg gaa gaa gat gaa gaa gat gaa gaa gat agt cta gat Lys Leu Lys Val Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp Ser Leu Asp 290 295 300 912			
gaa aaa aga agt gat gtt aga tca gac tca atg tca gct caa aga tca Glu Lys Arg Ser Asp Val Arg Ser Asp Ser Met Ser Ala Gln Arg Ser 305 310 315 320 960			
ata aaa tca ttt act gct tct ttg gaa ggt tca aag agt gtt tct aaa Ile Lys Ser Phe Thr Ala Ser Leu Glu Gly Ser Lys Ser Val Ser Lys 325 330 335 1008			
ctt att ctg aat agt ggg aag aag atc aat tgt cct aag aat aat tgt Leu Ile Ser Asn Ser Gly Lys Lys Ile Asn Cys Pro Lys Asn Asn Cys 340 345 350 1056			
gat aga atg ttt tct aga gaa tat gat tta cgt cga cat ttg aaa tgg Asp Arg Met Phe Ser Arg Glu Tyr Asp Leu Arg Arg His Leu Lys Trp 355 360 365 1104			

cat gat gat aat tta caa aga att gag tca ttc tta aat agt ata gaa	1152
His Asp Asp Asn Leu Gln Arg Ile Glu Ser Phe Leu Asn Ser Ile Glu	
370 375 380	
aaa gaa gaa act cca gaa ggt gaa cca ttg gtt aaa aaa gcc agg atg	1200
Lys Glu Glu Thr Pro Glu Gly Glu Pro Leu Val Lys Lys Ala Arg Met	
385 390 395 400	
gat tta ttg cca aat gaa aca tca gtg att tct cga taa	1239
Asp Leu Leu Pro Asn Glu Thr Ser Val Ile Ser Arg	
405 410	
<210> 3	
<211> 412	
<212> PRT	
<213> Candida albicans	
<400> 3	
Met Ser Glu Ser Asp Glu Thr Lys Ser Ile Ser Ser Leu Ile Ser Ser	
1 5 10 15	
Ser Ser Ser Ser Arg Pro Lys Lys Tyr Ile Cys Thr Tyr Glu Gly Cys	
20 25 30	
Asp Lys Ala Tyr Asn Arg Pro Ser Leu Leu Glu Gln His Leu Arg Thr	
35 40 45	
His Ser Asn Asp Arg Pro Tyr Lys Cys Thr Val Asp Asp Cys Asp Lys	
50 55 60	
Ala Phe Phe Arg Lys Ser His Leu Glu Thr His Ile Val Ser His Ser	
65 70 75 80	
Glu Lys Lys Pro Phe His Cys Ser Val Cys Gly Lys Gly Val Asn Ser	
85 90 95	
Arg Gln His Leu Lys Arg His Glu Ile Thr His Thr Lys Ser Phe Lys	
100 105 110	
Cys Thr Phe Glu Asn Cys Gln Glu Ala Phe Tyr Lys His Gln Ser Leu	
115 120 125	
Arg His His Ile Leu Ser Val His Glu Lys Thr Leu Thr Cys Lys Gln	
130 135 140	
Cys Asn Lys Val Phe Thr Arg Pro Ser Lys Leu Ala Gln His Lys Leu	
145 150 155 160	
Lys His His Gly Gly Ser Pro Ala Tyr Gln Cys Asp His Pro Gly Cys	
165 170 175	
Phe Lys Asn Phe Gln Thr Trp Ser Val Leu Gln Phe His Ile Lys Gln	
180 185 190	
Ser His Pro Lys Leu Lys Cys Pro Lys Cys Gly Lys Gly Cys Val Gly	
195 200 205	
Lys Lys Gly Leu Ser Ser His Met Leu Ser His Asp Asp Ser Thr Met	
210 215 220	
Ile Lys Ile Trp Thr Cys Asp Tyr Cys Asp Val Gly Lys Phe Ala Lys	
225 230 235 240	

Lys Asn Glu Leu Val Glu His Tyr Asn Ile Phe His Asp Gly Asn Ile  
 245 250 255  
 Pro Asp Asp Leu Leu Lys Glu Thr Glu Val Lys Lys Leu Glu Asn Leu  
 260 265 270  
 Leu Asp Gln Gly Ser Lys Leu Asn Asn Leu His Glu Leu Glu Thr Glu  
 275 280 285  
 Lys Leu Lys Val Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp Ser Leu Asp  
 290 295 300  
 Glu Lys Arg Ser Asp Val Arg Ser Asp Ser Met Ser Ala Gln Arg Ser  
 305 310 315 320  
 Ile Lys Ser Phe Thr Ala Ser Leu Glu Gly Ser Lys Ser Val Ser Lys  
 325 330 335  
 Leu Ile Ser Asn Ser Gly Lys Lys Ile Asn Cys Pro Lys Asn Asn Cys  
 340 345 350  
 Asp Arg Met Phe Ser Arg Glu Tyr Asp Leu Arg Arg His Leu Lys Trp  
 355 360 365  
 His Asp Asp Asn Leu Gln Arg Ile Glu Ser Phe Leu Asn Ser Ile Glu  
 370 375 380  
 Lys Glu Glu Thr Pro Glu Gly Glu Pro Leu Val Lys Lys Ala Arg Met  
 385 390 395 400  
 Asp Leu Leu Pro Asn Glu Thr Ser Val Ile Ser Arg  
 405 410

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Candida albicans

<400> 4  
 atgagtgaaa gtgacgaaac c

21

<210> 5  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Candida albicans

<400> 5  
 attggaatgg ttttttttcg gaat

24

<210> 6  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Candida albicans

<400> 6  
 tggtttcgtc actttcactc att

23

<210> 7  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Candida albicans

<400> 7  
atgttaagtc atgatgattc tacca

25

<210> 8  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Candida albicans

<400> 8  
ccttagaatt caccatgagt gaaagtg

27

<210> 9  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Candida albicans

<400> 9  
gctgagctcg agtattatcg agaaatc

27